4）光毒性試験代替法　特に3T3 NRU PT試験について

田中憲穂
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

1．背景

光毒性は、化粧品のように人の皮膚に直接塗布した後、太陽光に曝露されて発現する場合だけでなく、医薬品に代表されるように、経口、経気道より生体内に取り込まれて発現する場合もある。また最近、大気や河川の泥の中などの環境汚染物質の中にも光毒性物質の存在が報告[1,2]されており、このような物質がヒトや生物に対してどのような影響を及ぼすのかについては、今後の研究の進展が待たれる状況でもある。

光毒性についての毒性発現のメカニズムは、関与する化学物質の特性により多様で、化学物質が生体組織上で光に曝露されることによって生じる活性酸素やフリーラジカルの生成、DNAとの共有結合、毒性物質の生成など、様々な要因が考えられる。細胞レベルでの標的は、細胞膜、細胞小器官、核などである。細胞膜などが標的となる場合、濃度が高いと細胞死につながることが多い。一方、核が標的となる場合に生じる遺伝的傷害は、発がんの初期ステップとして大きな問題となり、皮膚発がんの要因ともなりうる。

2．動物を用いる光毒性試験

光毒性物質の存在は古く(1900年)から分かっており、アクリジン水溶液中でのゾウリムシに対する光毒性の報告は良く知られている。動物実験により予測する方法もかなり古くから行われている。しかしながら、研究者がそれぞれ条件の異なる独自の方法で実施しており、標準化された方法がないため、データの比較が難しい。結果に影響を及ぼす実験条件としてあげられるのは、動物種、系統、曝露部位、毛の除去、検体の適用濃度、検体の着色度合、溶媒や媒体の種類、投与経路、投与と光照射の時間と間隔、照射光源、UV線量、などがある。たとえば、光源(キセノン蛍光管、メタルハライドランプ等)にはそれぞれ固有の波長パターンがあり、波長によって皮膚への透過特性など作用の様相が異なる。従って、使用するフィルターの減衰波長にも留意しなければならない。また、モルモット、ウサギ、ラットなど、用いる動物種によって皮膚反応が異なり、検体の適用濃度と、光毒性反応の関係が異なる。

動物を用いる光刺激性試験のガイドラインとしては、OECDでその案(1995年[3])が提案されている。その中で、動物実験によって光毒性試験を実施する前に、まず *in vitro* の試験を実施すべきであることが強く提案されている。その結果、*in vitro* 試験で陽性の場合は、*in vivo* での試験は必要でなくなる可能性もある。一方、陰性の場合は動物実験で確認することとされている。このような状況により、*in vitro* 試験法の重要性がますます高くなってきている。

3．細胞を用いる *in vitro* 光毒性試験

動物を用いる毒性試験の代替法については多くの方法が開発され、有望な試験系については施設間で大規模な評価試験(validation study)が行われている。とりわけ、光毒性試験における3T3 NRU PT(The 3T3 mouse fibroblast neutral red uptake phototoxicity test)試験に関しては、これまで実施されてきたいくつかの毒性試験に関する評価試験の中で、行政的に受け入れられる可能性が高い代替法として注目されている。3T3 NRU PT試験の方法は下記の通りである。

(1) 試験に用いるUVA光源とUVAメー

ター

太陽光に近いスペクトル分布を示す水銀蒸着メタルハライドランプ(SOL 500、Dr. Hönle社、Martinsried、Germany)を用いる。UVBの波長をカットするため、335 nmの波長で50%の透過率を持つフィルター(フィルター：H1、Dr. Hönle社)を用い、照射線量は補正済みのUVAメーターで測定する。

(2) 試験の方法

対数増殖期にあるBALB 3T3細胞を10^4細胞／ウェルとなるように96ウェルプレートに播種し、24時間培養する。各ウェルをEBSS(Earle's Balanced Salt Solution)で洗浄後、EBSSに調製した被験物質を添加する。各被験物質はDWまたはDMSOに溶解後、溶媒の最終濃度が1% v/vとなるようにEBSSで調製する。1検体につき、UVA照射用と非照射用の2プレートずつ調製し、各プレートの検体濃度は各条件の細胞毒性から決定する。検体を添加した後に、インキュベーター中で1時間放置後、1枚をUVA1.6 mW/cm^2で50分(5J)照射し、残った1枚は遮光下、室温で放置する。処理後、プレートをEBSSで2回洗浄し、各ウェルに培地を加え、更に24時間培養する。培養終了後、NR法によって細胞毒性を測定する。

光毒性物質と非光毒性物質を判定するための指標として、UVA照射条件と非照射条件で得られたIC_{50}値の比をphotoirritation factor (PIF)として表す。PIFが5倍以上の場合、すなわち、照射条件下でのIC_{50}値が非照射条件下の1/5以下の場合、光毒性物質とし、それ以上を非光毒性物質としている。

4．バリデーションスタディ

ここに示された3T3 NRU PT試験を含む各種光毒性試験の評価試験は、EU/COLIPAによって企画(1991)され、種々の*in vitro*試験法の中でどの方法が、局所もしくは全身的に投与された化学物質の、ヒトへの光炎症反応を精度よく推定することができるかを目的として行われた。このEU/COLIPAによる3T3 NRU PT試験に関する評価試験の結果について簡単に示す。

Phase Iの評価試験(1992-1993)[4)]は、Phase IIでの本試験に加える試験法を選択するための予備試験として6つの機関により実施され、光毒性を明らかに示す11物質、UV吸収を示す5物質、UV吸収を示さない4物質を用いて、9つの試験系について評価がなされた。その結果、Phase Iの評価試験では3T3 NRU PT試験、赤血球の溶血とヘモグロビン酸化の組み合わせ、そしてSkin^{2}試験などの光毒性試験が*in vivo*の結果とよい相関を示した。中でも、3T3 NRU PT試験が全ての化学物質について精度よく評価することができたことから、Phase IIの評価試験のコアになる試験として採用された。

Phase II(1994-1995)[5)]の結果では、7種の試験系について9つの機関によって評価がなされた。被験物質の選択にあたっては、光毒性および光アレルギー物質の主要な物質をカバーし、更にヒトパッチテストのデータがあるものについても重視した。また、*in vitro-in vivo*の光毒性データベースおよび*in vivo*動物のデータについても十分に考慮し、30物質についてテストした。3T3 NRU PT試験の限界となる情報を得るため不溶性物質を含み、すべてコード化して試験を実施した。

その結果、光毒性物質に関してはラボ間で得られたデータのバラツキは極めて低く、しかも感度93%、特異性84%、陽性の予測値96%、陰性の予測値は73%で、本法が極めて信頼性の高い方法であることが示された。

5．問題点

本法で検出できる光毒性物質の中には、光アレルギー物質や光遺伝毒性物質も含まれる可能性がある。従って、それぞれの毒性の発現に関するend pointを適切に検出する方法の開発が必要である。また、培養細胞での光毒性試験は、生体組織の状態と異なって、細胞は被検物質とともにEBSS中で光照射される。従って、*in vitro*特有の反応が起こることが考えられることから、高感度な動物実験系の開発も必要である。そして*in vivo*の光毒性試験として提案されている方法[3)]に関しても、更に検討を加え、3T3 NRU PT試験によるスクリーニングと、必要であれば、*in vivo*試験も組み合わせた光毒性試験を実施することが実用的と考える。

6．今後の方向

このように開発された代替法が評価試験で認められ、更に行政的にガイドラインといった形で受け入れられる条件としていくつかの基準が考慮されている(OECD workshop、Solna、January 1996[6])。例えば、対照となる試験は、行政が求めるそれぞれのカテゴリー(化粧品、医薬、農薬など)の物質についての充分なデータがあること、既存の方法よりヒトへのリスク評価に関してデータが得られること、簡便でコストがかからないことなどである。3T3 NRU PT試験は、そのような条件を満たすと評価(ECVAM、Oct. 1997)されており、現在、EU/COLIPAの評価試験でのSOPを基にして、OECDのガイドライン案が準備されている。手続き的には、ECVAMとCOLIPAにより案の検討がなされた後、ECVAMとEUのDG (Direction Generale) XIにおいて、European Chemical Bureau(ECB)の承認を得る過程を経て、1998年度の早い時期にOECDガイドライン案として提案される予定である。

7．参考文献

1) Nakagawa, Y., Wakuri, S., Takahashi, A., and Tanaka, N. (1997) Photogenotoxicity of polycyclic aromatic hydrcarbons, Proceedings of the International Workshop on Comparative Evaluation of Health Effect of Environmental Toxicants Derived from Advanced Technologies, held in Chicba, in Press.

2) 田中憲穂(1997) 細胞を用いる培養毒性物質の高感度検出，第3回エコトキシコロジー研究会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会，講演要旨集，1-2.

3) OECD ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY DIVISION (1995) Acute dermal phototoxicity screening test; draft proposal for a new guideline, OECD Publication Office, Paris, France, 10.

4) Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Döring, B., Holzhütter, H. G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Papa, W. J. W, Pfannenbecker, U., Patthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994) EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxicol in Vitro, 8, 793-796.

5) Spielmann, H., Balls, M., Pechovitch, G., Dupuis, J., De Silva, O., Papa, W. J. W. and Holzhütter, H. (1997), A validation study of in vitro photoirritation tests in a joint EU/COLIPA project: preliminary report, In Animal Alternatives, Welfare and Ethics. edited by Zutphen, L.F.M. and Balls, M., Elsevier Science B.V., 1135-1143

6) Koëter, Herman B. W. M. (1997), The worldwide acceptance of validated alternative test, In Animal Alternatives, Welfare and Ethics. edited by Zutphen, L.F.M. and Balls, M., Elsevier Science B.V., 1165-1172